

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. August 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/078110 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:
C12R 1/645

C12P 5/00 //

(74) Anwälte: WEISS, W. usw.; Weickmann & Weickmann,
Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001346

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:

10. Februar 2005 (10.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2004 006 825.9

11. Februar 2004 (11.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAXENS GMBH [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Str. 32, 83308 Trostberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Martin [DE/DE]; Egilbertstr. 10, 85354 Freising (DE). DIRLAM, Kerstin [DE/DE]; Attacher Weg 37, 85356 Freising (DE). WENK, Hans, Henning [DE/DE]; Jagdstr. 13, 85354 Freising (DE). BERGER, Ralf, G. [DE/DE]; Karl-Jakob-Hirsch Weg 33, 30455 Hannover (DE). KRINGS, Ulrich [DE/DE]; Brokeloher Dorfstr. 38, 31628 Landesbergen (DE). KASPERA, Rüdiger [DE/DE]; Tübinger Str. 6, 26125 Oldenburg (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF FLAVOR-ACTIVE TERPENES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON AROMAAKTIVEN TERPENEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing flavor-active terpenes from terpene hydrocarbons. According to said method, a lyophilized mycel which is first rehydrated and is then mixed with the substrate is used preferably in a submerged culture in the framework of selective biotransformation with the aid of microorganisms. The inventive method, which can be carried out especially in an enantioselective, stereoselective, and/or regioselective manner, makes it possible to obtain terpenoid alcohols, epoxides, aldehydes, ketones, polyalcohols, carbonyls, and carbonyl alcohols with the aid of fusarium, pleurotus, penicillium, and chaetomium species, the obtained substances being isolated particularly from cellular components. Said method should be carried out above all in a stirred tank, surface reactor, or fixed bed reactor while preferably taking place in a two-phase system with reduced carbon source moieties. The obtained flavor-active terpenes are used as flavors and fragrances preferably in the food, cosmetic, and pharmaceutical industry.

(57) Zusammenfassung: Mit dem beschriebenen Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen aus Terpenkohlenwasserstoffen wird im Rahmen einer selektiven Biotransformation mit Hilfe von Mikroorganismen vorzugsweise in submerser Kultur ein lyophilisiertes Mycel eingesetzt, welches zuerst rehydratisiert und dann mit dem Substrat versetzt wird. Mit diesem Verfahren, das insbesondere enantio-, stereo- und/oder regioselektiv durchgeführt werden kann, werden mit Hilfe von Fusarium, Pleurotus, Penicillium und Chaetomium-Arten terpenoide Alkohole, Epoxide, Aldehyde, Ketone, Mehrfach-Alkohole, Carbonyle und Carbonylalkohole erhalten, die insbesondere aus zellulären Komponenten oder Fraktionen isoliert werden. Das Verfahren, das insbesondere in Rührkessel-, Oberflächen- oder Festbettreaktoren durchgeführt werden sollte, findet vorzugsweise in einem Zweiphasensystem mit reduzierten Anteilen an Kohlenstoffquellen statt. Verwendung finden die so erhaltenen aromaaktiven Terpene als Geschmacks-, Geruchs- und Aromastoffe vorzugsweise in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie.

WO 2005/078110 A1



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen mit Hilfe einer selektiven Biotransformation.

Aromen und Riechstoffe spielen in der heutigen Gesellschaft eine große Rolle. Geruchsaktive Stoffe werden in einer Vielzahl von Produkten des täglichen Lebens, wie Parfümen, Kosmetika, Lebensmitteln, Pharmaka und Haushaltsprodukten, verwendet. Beispielsweise werden 15 % aller auf dem Markt befindlichen Lebensmittel durch Zusätze aromatisiert. Die Gewinnung von Aromastoffen mittels Extraktion oder Destillation erfolgt auch heute noch aus verschiedensten Pflanzenteilen (Früchte, Blüten, Samen, Wurzeln u.v.m.). Extrakte oder auch isolierte Verbindungen kommen als hochwertige Produkte (z.B. in der Parfümindustrie als "essence absolue") in den Handel.

Der weiterhin zunehmend große Bedarf an Aromastoffen kann nicht mehr allein über natürliche Extrakte gedeckt werden, weshalb die Herstellung von Aromastoffen zu ca. 80 % durch chemische Synthesen erfolgt. Die Synthesestufen sind oft aufwendig, wenig spezifisch und so können die Produkte gemäß der Aromenverordnung (i.d.F. vom 18.06.2001) lebensmittelrechtlich lediglich als "naturidentisch", aber nicht als "natürlich" deklariert werden. Laut Aromenverordnung können natürliche Aromen "...durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft..." hergestellt werden. Deshalb ist die Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur Herstellung von natürlichen Aromastoffen eine sinnvolle Alternative. Die Herstellung von Aromen mittels Biotransformationen, d.h. der biokatalytischen Umwandlung von Ausgangskomponenten zu Syntheseprodukten durch z.B. mikrobielle Metabolisierung, spricht den erzeugten Aromastoffen entsprechend weiterhin das Prädikat "natürlich" zu, womit sie vor allem beim Konsumenten eine entscheidend höhere Akzeptanz gewinnen.

Eine wichtige Gruppe der Aromastoffe bilden die Terpenkohlenwasserstoffe und ihre Oxidationsprodukte, die Terpenoide. Als weit verbreitete Naturstoffe sind ihre sensorischen oder pharmakologischen Wirkungen schon seit langer Zeit bekannt. Mono- und Sesquiterpene dienen als Produkte des Sekundärstoffwechsels in der Pflanzen- und Tierwelt als Lockstoffe oder aufgrund ihrer toxischen Wirkung als Fraßschutz. Sie wirken ebenfalls als Signalstoffe und Phytohormone. So dienen z.B. mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommene und metabolisierte Terpene den Insekten als Soziohormone oder Kommunikationspheromone. Olfaktorisch aktive Terpene zeichnen sich häufig durch außerordentlich niedrige Geruchsschwellen aus und bilden als sogenannte "character impact compounds" den aromabildenden Inhaltsstoff einer bestimmten Aromanote, z.B. Rosenoxid für Geranienduft mit einer Geruchsschwelle von $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ als typisches Orangenaroma.

Als Ausgangsverbindungen zur Herstellung von Terpenoiden bieten sich ihre natürlichen Vorstufen an. Diese weniger interessanten Mono- wie auch Sesquiterpenkohlenwasserstoffe werden von den hochwertigen Terpenoiden abgetrennt und fallen als "Abfall" in Tonnenmaßstäben an. So wird das Monoterpen R-(+)-Limonen als Abfallstoff aus der Orangenölverarbeitung in Mengen von mehr als 100.000 t pro Jahr produziert und preiswert gehandelt. Es kommt als Hauptkomponente des Orangenschalenöls mit einem Gehalt von mehr als 90 % vor und fällt bei der Rektifizierung an. Aufgrund ihrer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und ihrer strukturellen Ähnlichkeit bilden die Terpenkohlenwasserstoffe ideale Grundstoffe zur Herstellung der korrespondierenden Oxidationsprodukte durch chemische oder biokatalytische Synthesen.

Für eine Terpenbiotransformation kann auf eine nahezu unbegrenzte Anzahl an Biokatalysatoren wie z.B. Bakterien, Hefen, Pilze und Pflanzenzellen zurückgegriffen werden, wobei sich Pilze als besonders aktive Biokatalysatoren herausgestellt haben. Nach heutigem Kenntnisstand sind mehr als 100.000 Arten aus dem Reich der Mycobionta (Pilze) bekannt, von denen einige Organismen der Wirtschaft Zugang zur Produktion einer Reihe wichtiger Verbindungen, wie z.B. Antibiotika, Vitamine, organische Säuren, verschafft haben. In der Biotechnologie unterscheidet man hierbei zwischen der *de novo* Herstellung, also der direkten Ausscheidung als Stoffwechselprodukt durch vitale Zellsysteme und der Biotransformation, mit der

strukturähnliche Vorstufen (Precursoren) durch gezielte funktionelle Reaktionen in die gewünschten Zielprodukte umgewandelt werden. Neben der direkten Produktion ist auch eine Vielzahl von Mikroorganismen in der Lage, xenobiotische und makromolekulare Substrate abzubauen und zu metabolisieren.

Insbesondere höhere Pilze, wie Basidiomyceten, besitzen durch ihr natürliches Habitat eine Vielzahl an oxidativ wirkenden Enzymen für den Holzabbau (z.B. Laccasen, Peroxidasen). Die zurzeit bekannten ca. 30.000 Arten der Basidiomyceten bieten sich daher besonders für oxidative Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen an. Bspw. kann der von Pflanzen ausgeschiedene Abwehrstoff α -Pinen durch eine mikrobielle Oxidation detoxifiziert werden. Der Vorteil von Pilzen gegenüber niederen Organismen, wie Bakterien, ist die wesentlich vielfältigere Ausstattung an Redoxenzymen mit hohem Oxidationspotential, was sie insbesondere zur Oxidation xenobiotischer Substanzen befähigt.

Aufgrund ihrer strukturellen Komplexität stellt die chemische Totalsynthese von Sesquiterpenoiden die Aromaindustrie allerdings vor außergewöhnliche Schwierigkeiten. Am einfachsten kann sie durch die Funktionalisierung von natürlichen Vorstufen durchgeführt werden, wobei sich chemische Synthesestufen aber als wenig selektiv herausgestellt haben.

Aus den bekannten Problemen des Standes der Technik hat sich für die vorliegende Erfindung deshalb die Aufgabe gestellt, ein Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen aus Terpenkohlenwasserstoffen zur Verfügung zu stellen, das im Rahmen einer selektiven Biotransformation und mit Hilfe von Mikroorganismen der Klasse Ascomycetes, Basidiomycetes und Deuteromycetes durchgeführt wird. Dabei stand die Bereitstellung eines Verfahrens im Vordergrund, welches auf einfache und wirtschaftliche Weise durchzuführen ist, dabei die selektiven Eigenschaften von enzymatischen Prozessen nutzt und ausgehend von leicht zugänglichen und kostengünstigen Ausgangsstoffen zu hochwertigen Produkten mit ausgeprägter Reinheit führt, die insbesondere für lebensmitteltechnische Anwendungen geeignet sind.

Gelöst wurde diese Aufgabe mit Hilfe eines entsprechenden Verfahrens, bei dem ein lyophilisiertes Mycel eingesetzt wird, welches zuerst rehydratisiert und dann mit dem Substrat versetzt wird.

Überraschend hat sich dabei herausgestellt, dass durch den Verfahrensschritt der Perforierung der Mycel-Zellen durch Lyophilisierungsmaßnahmen Enzymsysteme in Ganzzellkulturen genutzt werden können, wobei das Kulturmedium mit keinen zusätzlichen Aktivatoren versetzt werden muss. Gemäß Aufgabenstellung werden mit diesem Verfahren nicht nur die gewünschten aromaaktiven Terpene in hervorragenden Qualitäten erhalten, sondern es ist auch möglich, durch die Auswahl geeigneter Mikroorganismen die gewünschten Verbindungen enantio-, stereo- bzw. regioselektiv herzustellen und durch verfahrenstechnisch einfache Maßnahmen aus dem Reaktionsmedium zu gewinnen. Insbesondere war bislang die enantioselektive Herstellung von Monoterpeoiden durch Biotransformation aufgrund des Mangels an geeigneten Organismen und Enzymen nur sehr beschränkt möglich. Aufgrund der bisherigen Schwierigkeiten, wie sie aus chemischen Verfahren bekannt sind, aber auch aus Verfahrensvarianten der Biotransformation, waren die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens in dieser Ausprägung nicht zu erwarten.

Wie bereits angedeutet, ist ein erfindungswesentlicher Vorteil des vorliegenden Verfahrens darin zu sehen, dass ein lyophilisiertes Mycel eingesetzt wird. Um die Vorteile dieses Verfahrensmerkmals noch besser nutzen zu können, sieht die vorliegende Erfindung vor, dass ein Mycel eingesetzt wird, dessen Zellen zusätzlich durch Ultraschallbehandlung und/oder eine Extrusion permeiert wurden.

Die verwendeten zellulären Biokatalysatoren können somit vor ihrem Einsatz in der eigentlichen Transformationsreaktion so vorbehandelt werden, dass die Ausgangsverbindungen zunächst die Zellwand durchdringen und anschließend in die Zellmembranen diffundieren können. Die Nachteile der Zellmembran als osmotische Barriere werden damit überwunden und die damit üblicherweise verbundene und bislang bekannte Hemmung der Biotransformation, wie sie bspw. in Form einer Verlangsamung des Influx von Substraten und des Eflux von Produkten stattfindet, kann reduziert oder gänzlich vermieden werden. Durch die Perforierungsmaßnahmen kann der Austausch an Substraten deutlich beschleunigt werden, da hauptsächlich durch die Lyophilisierung eine Störung der Membranintegrität bewirkt wird, wobei

allerdings die darin enthaltenen Enzymsysteme intakt bleiben, gleichzeitig aber leichter zugänglich werden.

Als besonders günstig hat es sich erwiesen, wenn das vorgeschlagene Verfahren in submerser Kultur durchgeführt wird. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist darin zu sehen, dass die Biotransformation enantioselektiv, stereoselektiv und/oder regioselektiv durchgeführt werden kann.

Eine bedeutende Rolle für das Gelingen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommt der Auswahl geeigneter Mikroorganismen zu. In diesem Zusammenhang berücksichtigt die vorliegende Erfindung eine Variante, bei der als Biokatalysatoren Vertreter von *Fusarium*, *Pleurotus*, *Penicillium* und *Chaetomium* eingesetzt werden. Als besonders geeignet haben sich *Fusarium proliferatus*, *Pleurotus sapidus*, *Penicillium citrinum* und *Chaetomium globosum* erwiesen.

Im Hinblick auf die zu gewinnenden aromaselektiven Terpene werden von der vorliegenden Erfindung Mono- und Sesquiterpene als Ausgangsterpenkohlenwasserstoffe bevorzugt, wobei Limonen und insbesondere R-(+)-Limonen oder S-(-)-Limonen sowie Pinen, Valencen, Farnesen, Thymol und Dimethylallylalkohol als besonders geeignet anzusehen sind.

In bestimmten Fällen kann es günstig sein, im lyophilisierten Mycel vor der eigentlichen Biotransformation eine Enzyminduktion durchzuführen, wofür sich die Zugabe von Substrat als geeignet erwiesen hat. Üblicherweise werden die Lyophilisate des Mycels nach ihrer Rehydratisierung in einem Puffer mit einer bestimmten Menge an Substrat versetzt, wodurch sich die Pilzkultur adaptiert und eine Induktion von Enzymen, die zur Terpenoxidation geeignet sind, erreicht wird. Die eigentliche Zugabe des Ausgangsterpenkohlenwasserstoffs erfolgt dabei nach wenigen Stunden bis zwei Tagen.

Die vorliegende Erfindung sieht als weitere bevorzugte Variante vor, die Biotransformation in einem zweiphasigen System aus Wasser und einer organischen Phase durchzuführen, wobei sich insbesondere n-Decan als geeignete Phase erwiesen hat. Besonders bevorzugt wird die Biotransformation ohne Zugabe von Co-Solventien durchgeführt, was die vorliegende Erfindung ebenfalls berücksichtigt.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die Biotransformationsreaktion in einem Medium durchgeführt werden kann, das eine verringerte Menge M der sonst üblichen Kohlenstoffquelle, wie bspw. Glucose, enthält, wodurch eine höhere Biotransformation des angegebenen Substrats erfolgt. M ist vorzugsweise $< 50 \text{ gL}^{-1}$, stärker bevorzugt $< 25 \text{ gL}^{-1}$ und am stärksten bevorzugt $< 10 \text{ gL}^{-1}$.

Üblicherweise werden Biotransformationsreaktionen in wässrigen Systemen durchgeführt, wobei die Verwendung organischer Lösemittel die Verfügbarkeit lipophiler Substrate erhöht, wenn das Verteilungsgleichgewicht von Edukt und Substraten/Produkten im wässrigen Medium nachteilig ist. Wie bereits beschrieben, wurde ein geeignetes Lösemittel in Form eines Zweiphasensystems ermittelt, wobei n-Decan die organische Phase darstellt. Wird n-Decan demgegenüber als Co-Solvents eingesetzt, kann es in Abhängigkeit vom eingesetzten Mycel zu einer Aktivitätsinhibierung bei den Enzymen kommen, weshalb die vorliegende Erfindung auch empfiehlt, auf Co-Solventien zu verzichten.

Im Hinblick auf die Endprodukte sieht das erfindungsgemäße Verfahren vor, diese aus zellulären Komponenten oder Zellfraktionen des Mycels zu isolieren.

Üblicherweise reichern sich lipophile Substanzen zu über mehr als 90 % im Mycel und hier insbesondere in Zellwand- und Membranfraktionen an. Ein verschwindend geringer Teil von ca. nur 5 % wird im wässrigen Medium gefunden.

Da es für eine erfolgreiche Biotransformation auch einer optimalen Sauerstoffzufuhr bedarf, empfiehlt es sich, das vorgeschlagene Verfahren in entsprechenden Vorrichtungen, wie bspw. Rührkessel-, Oberflächen- und Festbettreaktoren durchzuführen, welche die vorliegende Erfindung insbesondere empfiehlt. Der Stoffwechselweg der Terpene im jeweiligen Mikroorganismus spielt bei zahlreichen Biotransformationen eine wichtige Rolle. Dabei ist bekannt, dass für einige Mikroorganismen eine Co-Oxidation der Terpensubstrate eine Rolle spielt, ohne dass eine Weiteroxidation und Metabolisierung stattfindet. Insbesondere wenn nährstoffreiche Medien verwendet werden, erscheint eine Metabolisierung von Terpenen als C-Quelle nicht notwendig. Andererseits können Terpenkohlenwasserstoffe als alleinige C-Quelle dienen und über eine β -Oxidation

metabolisiert werden. Insbesondere im Hinblick auf die im Kulturmedium anwesenden Kohlenstoffquellen hat es sich für das vorliegende Verfahren als vorteilhaft gezeigt, dass ein Glucose-Gehalt G mit $G \leq 0,5\%$ zur Anzucht transformationsaktiver Biomassen ausreicht. Ebenfalls bestätigt wurde, dass die organischen Hauptkomponenten des Kulturmediums, nämlich Kohlenstoff und Stickstoff, einen entscheidenden Einfluss auf die Transformationsausbeute haben. Dabei hat sich wieder als vorteilhaft erwiesen, wenn ein kohlenstoffarmes Medium, wie bereits angesprochen, verwendet wird, um so den Anteil an Oxidationsprodukten zu erhöhen, wobei es gelingt, eine weitergehende Mineralisierung des Zielproduktes zu unterbinden.

Insbesondere den ebenfalls bereits angesprochenen Schüttelvorrichtungen kommt eine weitere wichtige Rolle dahingehend zu, als Sauerstoff ein essentielles Co-Substrat der Oxidation von Terpenkohlenwasserstoffen ist und weshalb vor allem obligat aerobe Pilze, wie Ascomyceten, zur Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Prozesse und für eine optimale Biomasseproduktion ausreichende Sauerstoffmengen benötigen. Somit ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff während einer Kultivierung ausreichend zu gewährleisten, was mit den angesprochenen Rührkessel-, Oberflächen- oder Festbettreaktoren gelingt. Hinzu kommt eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung der Schüttelkultur, womit ein erhöhter Gasaustausch und verbesserte Massentransfer-Koeffizienten einhergehen.

Das vorliegende Verfahren hat sich insbesondere als geeignet erwiesen, als Endprodukte terpenoide Alkohole, Epoxide, Aldehyde, Ketone, Mehrfach-Alkohole, Carbonyle und Carbonylalkohole zu erhalten. Besonders bevorzugt in diesem Zusammenhang werden Piperiton, Isopiperiton, Isopiperitenol, Isopiperitenon, Perillaaldehyd, Carvon, Carveol, Linalool, Linalooloxid, Terpeneol sowie Nootkatol und Nootkaton angesehen.

Schließlich berücksichtigt die vorliegende Erfindung auch noch Verfahrensvarianten, mit denen gezielt aromaaktive Terpene hergestellt werden können. So wird insbesondere empfohlen, erst enantioselektiv R-(+)-Limonen zu cis-(+)Carveol und S-(-)-Limonen zum trans-(-)-Carveol zu biotransformieren, wofür sich insbesondere spezielle Fusarium-Arten als Biokatalysatoren als geeignet erwiesen haben.

Anschließend kann das so erhaltene trans-(-)-Carveol zum R-(-)-Carvon umgesetzt werden, wobei dann *Pleurotus spec.*-Stämme verwendet werden sollten.

Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls die Biotransformation bicyclischer Sesquiterpene zu β -Nootkatol und anschließend zu Nootkaton, wofür *Chaetomium*-Spezies empfohlen werden.

Neben dem beschriebenen Verfahren und seinen diversen Varianten berücksichtigt die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der damit erhältlichen Terpene als Geruchs-, Geschmacks- und Aromastoffe, wobei insbesondere deren Verwendung in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie als bevorzugt anzusehen sind.

Das beschriebene Verfahren ermöglicht die Veredelung bestimmter Terpenkohlenwasserstoffe, wie bspw. Limonen, Valencen und Farnesen zu hochwertigen aromaaktiven Verbindungen, wie Carvon, Nootkaton und 7-Hydroxy-Farnesen durch eine mikrobielle Biotransformation. Dabei ist es möglich, die gewünschten aromaaktiven Terpene durch Auswahl geeigneter Pilzkulturen und insbesondere die Anwendung der daraus gewonnenen lyophilisierten Mycele in wirtschaftlich vorteilhafter Weise in größeren Mengen und sehr guter Qualität zu erhalten, wobei die biokatalytische Reaktionsführung insgesamt einfach in submerser Kultur in geeigneten Vorrichtungen durchgeführt werden kann.

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Vorteile des beanspruchten Verfahrens.

Beispiele

Für die nachfolgenden Beispiele wurden als Biokatalysatoren Mycelien eingesetzt, die in Submers-Kulturen bei 24 °C und 150 Upm angezüchtet wurden.

Nach 3 bis 7 Tagen Wachstumszeit wurden von diesen Vorkulturen 10 mL homogenisiertes Medium in 200 mL SNLH-Medium überführt und bei 24 °C und 150 Upm kultiviert. Zur Adaptation der Kultur wurden anschließend 20 µL des jeweiligen Terpens nach drei bis fünf Tagen Wachstumszeit zur Kultur gegeben. Die Zellmasse wurde dann durch Zentrifugation (2000 g, 10 min.) abgetrennt, mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung gewaschen und unter flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gefriertrocknung bzw. Lyophilisierung (Anlage Finaqua Lyovac GT2) wurde bei Raumtemperatur und bei 2×10^{-5} bar für ein bis vier Tage (je nach Kultur) durchgeführt.

Transformationsbedingungen:

Zur Rehydratisierung der gefriergetrockneten Zellmasse wurde zerkleinertes Lyophilisat im Transformationsmedium (z. B. MOPS-Puffer, 4-[N-Morpholino]butansulfonsäure, Hefe-Nähmedium nach Sprecher und Hansen [1982]) 1 bis 24 h inkubiert. Die Zugabe des Terpenkohlenwasserstoffs (1 bis 300 mM) erfolgte direkt oder unter Verwendung von Lösemitteln. Die Terpenoidbildung wurde durch kontinuierliche Probenahme von Aliquots bestimmt. Die Terpenoide wurden durch Lösemittel-Extraktion gewonnen. Die Identifikation der Verbindungen erfolgte mittels GC-MS über authentische Standards, die Quantifizierung über GC-FID und die verwendeten internen Standards.

Beispiel 1:

Zur Transformation von Limonen wurden vom *Pleurotus sapidus*-Mycel 50 mg in 1,5 mL MOPS-Puffer (0,1 M; pH 7,0) gegeben und die getrocknete Zellmasse für eine Stunde bei 200 Upm und 24 °C rehydratisiert. Zur Carvon-Erzeugung wurden 41 mM Limonen direkt zu der rehydratisierten Kultur appliziert. Die Umsetzung erfolgte für 24 h bei 150 Upm und 24 °C. Proben wurden nach Zugabe des inneren Standards (z.B. Campher für Limonentransformation) mit 2 mL azeotropem Pentan/Ether-Gemisch extrahiert, zentrifugiert und über Nacht mit Na₂SO₄ getrocknet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von aromaaktiven Terpenen aus Terpenkohlenwasserstoffen mittels einer selektiven Biotransformation und mit Hilfe von Mikroorganismen der Klassen Ascomycetes, Basidiomycetes und Deuteromycetes, dadurch gekennzeichnet, dass ein lyophilisiertes Mycel eingesetzt wird, das zuerst rehydratisiert und dann mit dem Substrat versetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mycel-Zellen zusätzlich durch Ultraschallbehandlung und/oder Extrusion permeiert werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation in submerser Kultur vorgenommen wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation enantio-, stereo- und/oder regioselektiv durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Biokatalysatoren Vertreter von *Fusarium*, *Pleurotus*, *Penicillium* und *Chaetomium* und insbesondere *Fusarium proliferatus*, *Pleurotus sapidus*, *Penicillium citrinum* und *Chaetomium globosum* eingesetzt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Terpenkohlenwasserstoffe Mono- und Sesquiterpene und besonders bevorzugt Limonen, insbesondere R-(+)-Limonen oder S-(-)-Limonen, sowie Pinen, Valencen, Farnesen, Thymol und Dimethylallylalkohol verwendet werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im lyophilisierten Mycel vor der Biotransformation durch Zugabe von Substrat eine Enzyminduktion durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation in einem zweiphasigen System und vorzugsweise ohne Co-Solventien durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation in einem Medium mit einer verringerten Menge M an Kohlenstoffquelle durchgeführt wird, wobei M vorzugsweise $< 50 \text{ gL}^{-1}$ ist..
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion in einem Rührkessel-, Oberflächen- oder Festbettreaktor durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als aromaaktive Terpene terpenoide Alkohole, Epoxide, Aldehyde, Ketone, Mehrfach-Alkohole, Carbonyle und Carbonylalkohole und insbesondere Piperiton, Isopiperiton, Isopiperitenol, Isopiperitenon, Perillaaldehyd, Carvon, Carveol, Linalool, Linalooloxid, Terpeneol sowie Nootkatol und Nootkaton erhalten werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Transformationsprodukte aus zellulären Kompartimenten oder Fraktionen isoliert werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass zuerst, besonders bevorzugt mit *Fusarium spec.* als Biokatalysator, enantioselektiv R-(+)-Limonen zu cis-(+)-Carveol und S-(-)-Limonen zum trans-(-)-Carveol biotransformiert wird und anschließend trans-(-)-Carveol, besonders bevorzugt mit *Pleurotus spec.* als Biokatalysator, zu R-(-)-Carvon.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass bicyclische Sesquiterpene, besonders bevorzugt mit *Chaetomium spec.*, zu β -Nootkatol und anschließend zu Nootkaton transformiert werden.
15. Verwendung der mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestellten Terpene als Geruchs-, Geschmacks- und Aromastoffe, vorzugsweise in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2005/001346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P5/00
//C12R1/645

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,X	EP 1 424 071 A (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 2 June 2004 (2004-06-02) '15!-'20!	15
X	-& WO 02/053151 A (SHISEIDO COMPANY, LTD) 11 July 2002 (2002-07-11) -----	15
Y	ONKEN J ET AL: "Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete <i>Pleurotus sapidus</i> " JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 69, no. 2-3, 15 April 1999 (1999-04-15), pages 163-168, XP004168124 ISSN: 0168-1656 the whole document -----	1-14

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

° Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* *later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention*
- *X* *document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone*
- *Y* *document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.*
- *G* *document member of the same patent family*

Date of the actual completion of the international search

18 July 2005

Date of mailing of the international search report

01/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer _____

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/001346

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	<p>CROAN SUKI C: "Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina" MYCOLOGIA, vol. 92, no. 4, July 2000 (2000-07), pages 810-817, XP008049845 ISSN: 0027-5514 page 812, column 1, line 6 - column 2, line 6 page 813, column 2, paragraph 2 - paragraph 3; table 1 -----</p>	1-14
Y	<p>SUNDARI S KRISHNA ET AL: "Freeze-drying vegetative mycelium of Laccaria fraterna and its subsequent regeneration" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 13, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 491-495, XP008049838 ISSN: 0951-208X page 492, column 2, paragraph 2 - page 493, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-14
A	<p>TAUBERT J ET AL: "A comparative study on the disintegration of filamentous fungi" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, vol. 42, no. 3, November 2000 (2000-11), pages 225-232, XP002335974 ISSN: 0167-7012 page 228, column 2, paragraph 3 - page 229, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-14
T	<p>KASPERA RÜDIGER ET AL: "Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete Chaetomium globosum." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, JUN 2005, vol. 67, no. 4, June 2005 (2005-06), pages 477-483, XP002335975 ISSN: 0175-7598 the whole document -----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001346

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1424071	A	02-06-2004	EP 1424071 A1	02-06-2004
			US 2004242452 A1	02-12-2004
			CN 1538840 A	20-10-2004
			WO 02053151 A1	11-07-2002
			JP 2003119490 A	23-04-2003
			JP 2003119491 A	23-04-2003
<hr/>				
WO 02053151	A	11-07-2002	CN 1538840 A	20-10-2004
			EP 1424071 A1	02-06-2004
			WO 02053151 A1	11-07-2002
			JP 2003119490 A	23-04-2003
			US 2004242452 A1	02-12-2004
			JP 2003119491 A	23-04-2003
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001346

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P5/00
//C12R1/645

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 1 424 071 A (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 2. Juni 2004 (2004-06-02) '15!-'20!	15
X	-& WO 02/053151 A (SHISEIDO COMPANY, LTD) 11. Juli 2002 (2002-07-11)	15
Y	ONKEN J ET AL: "Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete Pleurotus sapidus" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 69, Nr. 2-3, 15. April 1999 (1999-04-15), Seiten 163-168, XP004168124 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument	1-14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Juli 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/08/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001346

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	<p>CROAN SUKI C: "Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina" MYCOLOGIA, Bd. 92, Nr. 4, Juli 2000 (2000-07), Seiten 810-817, XP008049845 ISSN: 0027-5514 Seite 812, Spalte 1, Zeile 6 - Spalte 2, Zeile 6 Seite 813, Spalte 2, Absatz 2 - Absatz 3; Tabelle 1</p>	1-14
Y	<p>SUNDARI S KRISHNA ET AL: "Freeze-drying vegetative mycelium of Laccaria fraterna and its subsequent regeneration" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, Bd. 13, Nr. 7, Juli 1999 (1999-07), Seiten 491-495, XP008049838 ISSN: 0951-208X Seite 492, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 493, Spalte 1, Absatz 1</p>	1-14
A	<p>TAUBERT J ET AL: "A comparative study on the disintegration of filamentous fungi" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, Bd. 42, Nr. 3, November 2000 (2000-11), Seiten 225-232, XP002335974 ISSN: 0167-7012 Seite 228, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 229, Spalte 1, Absatz 1</p>	1-14
T	<p>KASPERA RÜDIGER ET AL: "Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete Chaetomium globosum." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, JUN 2005, Bd. 67, Nr. 4, Juni 2005 (2005-06), Seiten 477-483, XP002335975 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument</p>	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001346

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1424071 A	02-06-2004	EP 1424071 A1	02-06-2004
		US 2004242452 A1	02-12-2004
		CN 1538840 A	20-10-2004
		WO 02053151 A1	11-07-2002
		JP 2003119490 A	23-04-2003
		JP 2003119491 A	23-04-2003
WO 02053151 A	11-07-2002	CN 1538840 A	20-10-2004
		EP 1424071 A1	02-06-2004
		WO 02053151 A1	11-07-2002
		JP 2003119490 A	23-04-2003
		US 2004242452 A1	02-12-2004
		JP 2003119491 A	23-04-2003